



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06343496 A**(43) Date of publication of application: **20.12.94**

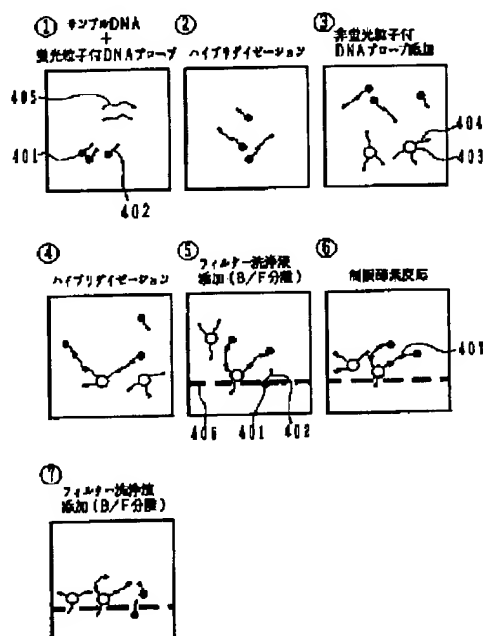
(51) Int. Cl.

C12Q 1/68**C12M 1/34**(21) Application number: **05133338**(22) Date of filing: **03.06.93**(71) Applicant: **HITACHI LTD**(72) Inventor: **MOMOSE JIYUNKO
IMAI KYOKO
NOMURA YASUSHI****(54) ANALYZING METHOD, ANALYZING APPARATUS AND REACTOR****(57) Abstract:**

PURPOSE: To obtain an analyzing method, an analyzing apparatus and a reactor, capable of automatically determining a nucleic acid in a sample in high sensitivity.

CONSTITUTION: A reagent of DNA probe 402 to which fine particles 401 provided with a labeled material are bound and a reagent of DNA probe 404 to which fine particles 403 having particle diameter larger than that of the fine particles 401 are injected into a reacting chamber 341 of a reactor 34a together with a sample. Then, a sample DNA 405 in the sample is hybridized with DNA probes 402 and 404 to form double-stranded chain and unbound excess fluorescence particles-labeled DNA probe 402 is removed using a filter 406 having the middle pore diameter between particle diameters of two kinds of fine particles. Then, a restriction enzyme 407 reacts with the formed double-stranded polynucleotide to cut the double-stranded chain part and isolated fluorescent fine particles 401 are fractionated with a filter 406 and introduced into a flow cell to count particle numbers. Thereby, separation of B/F and cleaning process is extremely simplified and automation of measurement is facilitated.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-343496

(43) 公開日 平成6年(1994)12月20日

(51) Int.Cl.⁵

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 M 1/34

識別記号

A 7823-4B

Z

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平5-133338

(22) 出願日 平成5年(1993)6月3日

(71) 出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72) 発明者 百瀬 潤子

茨城県勝田市市毛882番地 株式会社日立

製作所計測器事業部内

(72) 発明者 今井 恭子

茨城県勝田市市毛882番地 株式会社日立

製作所計測器事業部内

(72) 発明者 野村 靖

茨城県勝田市市毛882番地 株式会社日立

製作所計測器事業部内

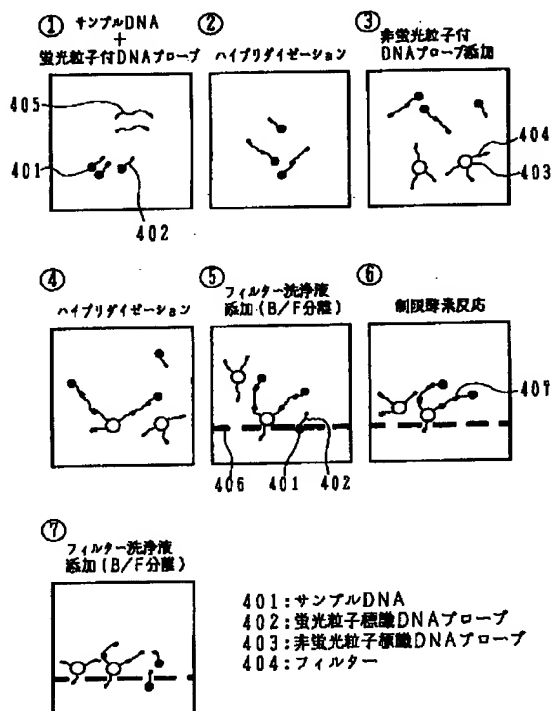
(74) 代理人 弁理士 春日 譲

(54) 【発明の名称】 分析方法及び分析装置並びに反応容器

(57) 【要約】

【目的】 自動的かつ高感度で試料中の核酸を測定することができる分析方法及び装置並びに反応容器を提供する。

【構成】 標識物の付いた微小粒子401を結合したDNAプローブ402の試薬と、微小粒子401より粒径の大きな微小粒子403を結合したDNAプローブ404の試薬とを試料と共に反応容器34aの反応室341に注入し、試料中のサンプルDNA405とDNAプローブ402、404とをハイブリダイズして二本鎖を形成した後、2種類の微小粒子の粒径の中間の孔径を持つフィルター406を用いて未結合の余剰蛍光粒子標識DNAプローブ402を除去し、その後、制限酵素407を作用させ二本鎖部位を切断し、遊離した蛍光性微小粒子401をフィルター406で分別し、フローセルに導入して粒子数を計数する。これによりB/F分離や洗浄工程が極めて簡単となり、測定の自動化が容易となる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 粒径の異なる2種類の微小粒子であって、一方の微小粒子は標識物の付いた小粒子で、他方の微小粒子は前記小粒子よりも大きな粒径を持つ大粒子としたものを用意すること、(b) 前記2種類の微小粒子を試料中の測定対象物を介して結合させること、

(c) 前記小粒子の粒径よりも大きく、前記大粒子の粒径よりも小さな孔径を持つフィルターを用いて未結合の小粒子を除去すること、(d) 測定対象物を介して結合した小粒子と大粒子の結合物を特異的に切断すること、

(e) 前記フィルターを用いて小粒子のみを分別すること、(f) その小粒子の標識物を測定することによって試料中の測定対象物の濃度を測定することを特徴とする分析方法。

【請求項2】 粒径の異なる2種類の微小粒子であって、一方の微小粒子は標識物の付いた小粒子で、他方の微小粒子は前記小粒子よりも大きな粒径を持つ大粒子としたものを用いて試料中の測定対象物の濃度を測定する分析装置において、

(a) 少なくとも1つの反応室、前記反応室の底部に配置され、前記小粒子の粒径よりも大きく、前記大粒子の粒径よりも小さな孔径を持つフィルター、このフィルターの更に下方に設けられた液体流下抵抗部材、前記反応室から前記フィルター及び液体流下抵抗部材を通過した液体を排出する小孔を有する反応容器と、

(b) 前記反応容器が複数個配列されるターンテーブルと、

(c) 前記反応容器の反応室に前記試料、前記2種類の微小粒子を含む試薬、洗浄液及び結合部位を特異的に切断する試薬を注入する分注供給手段と、

(d) 前記反応室と前記小孔との間に圧力差を発生させ、前記反応室内の液体を前記小孔から排出する圧力差発生手段と、

(e) 前記小孔から排出された液体に含まれる前記小粒子の標識物を計測し、試料中の測定対象物の濃度を測定する計測手段とを備えることを特徴とする核酸分析装置。

【請求項3】 請求項2記載の分析装置において、前記計測手段は前記反応容器の小孔を介して液体が導入されるフローセルを有し、このフローセルを通る小粒子の標識物に基づく光学的特性を測定して試料中の測定対象物の濃度を測定することを特徴とする分析装置。

【請求項4】 請求項3記載の分析装置において、前記反応容器の小孔は反応容器の下端に設けられた排出ノズルに形成され、この排出ノズルは前記フローセルの注入室入口に直接差し込まれることを特徴とする分析装置。

【請求項5】 粒径の異なる2種類の微小粒子であって、一方の微小粒子は標識物の付いた小粒子で、他方の微小粒子は前記小粒子よりも大きな粒径を持つ大粒子としたものを用いて試料中の測定対象物の濃度を測定する

分析方法に用いる反応容器において、

少なくとも1つの反応室と、前記反応室の底部に配置され、前記小粒子の粒径よりも大きく、前記大粒子の粒径よりも小さな孔径を持つフィルターと、このフィルターの更に下方に設けられた液体流下抵抗部材と、前記反応室から前記フィルター及び液体流下抵抗部材を通過した液体を排出する小孔とを有することを特徴とする反応容器。

【請求項6】 請求項5記載の反応容器において、前記反応室を形成しかつ前記フィルターを配置した第1の容器と、前記液体流下抵抗部材を配置しかつ前記小孔を形成した、前記第1の容器と別体の第2の容器とを有し、第1の容器と第2の容器は第1の容器の底部と第2の容器の頂部で結合可能であることを特徴とする反応容器。

【請求項7】 請求項5記載の反応容器において、前記液体を排出する小孔のほかに吸引用の小孔を更に有することを特徴とする反応容器。

【請求項8】 請求項5記載の反応容器において、前記反応室を含む複数の反応室を有することを特徴とする反応容器。

【請求項9】 請求項5記載の反応容器において、少なくとも1つの試料室を更に有し、前記試料室に前記標識物の付いた小粒子を含む試薬を保存液と共に収容したことを特徴とする反応容器。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は分析方法及び分析装置並びに反応容器に係わり、特に、測定対象物を粒子で標識した後に、粒子をフローセルに導いて計測し測定対象物の濃度を計測する分析方法及び分析装置並びにその分析方法に使用する反応容器に関する。

【0002】

【従来の技術】 感染症の診断には、病原性微生物の検出同定が必須である。しかし、感染症の原因微生物を培養によって検出同定するには時間がかかり、疾病の診断と治療に間に合わないことが多い。

【0003】 そこで近年、核酸ハイブリダイゼーションの技術を使用して、試料中の特定塩基配列の有無を調べることにより、感染症の病原菌の特定並びに感染症の発症前の診断が可能になってきた。

【0004】 即ち、DNAプローブを用いる方法である。これは、検出対象とする核酸の塩基配列に相補的な配列を有する一本鎖DNA（これをDNAプローブと呼ぶ）を特異的な反応試薬として利用するものである。試料中にDNAプローブの塩基配列と相補的な塩基配列の有無を検出することにより、目的病原菌の有無を判断できる。

【0005】 具体的な方法としては各種提案されてきた。例えば日本臨床、47巻、737-754（1989）等に紹介されている。例としては、ドットハイブリ

ダイゼーション法と呼ばれる方法がある。これは、試料を変性処理して得た一本鎖DNA (ss-DNA) を固相に結合させ、この固相にラジオアイソトープを標識した ss-DNA を作用させて固相の ss-DNA とハイブリットを形成させてから未反応の標識 ss-DNA を除去し、固相の放射能を測定する方法である。

【0006】この方法の変法として、サンドウィッチハイブリダイゼーション法がある。この方法では、吸着によるバックグラウンドを下げることができ、不純なサンプルを用いる場合に特に有効である。この方法では、識別しようとする標識核酸に由来するDNAフラグメントを少なくとも2つ使用する。一方のDNAフラグメントは固相に結合させて、捕獲試薬として使用する。もう一方のDNAフラグメントは検出試薬として標識し、ハイブリダイゼーション溶液に可容化した標本サンプルと一緒に加える。標本サンプル中に、両方の試薬に相同的な塩基配列が存在している場合には、その配列は、捕獲試薬にも検出試薬にもハイブリダイズするはずである。ハイブリダイズしたか否かは、固相への標識を介して知ることができる。

【0007】また、特公平3-78120号公報では制限酵素を用いる方法が提案されている。この方法では、測定対象である一本鎖ポリヌクレオチドを、標識物が結合されかつ測定対象一本鎖ポリヌクレオチドと反応して二本鎖ポリヌクレオチドを形成しえる一本鎖ポリヌクレオチドを結合した固相と溶液中で接触させて二本鎖ポリヌクレオチドを形成させて、形成した二本鎖ポリヌクレオチドに制限酵素を作用させてこの二本鎖ポリヌクレオチドを切断し、溶液または固相の標識物を測定する。

【0008】同様に、制限酵素又は選択可能な切断部位を導入した試薬を用いる方法が特開平2-92300号公報に示されている。

【0009】一方、核酸分析との関連付けはないが、免疫分析法でフィルターの下部に排出孔を設けた反応容器を使用する方法が特開平2-228562号公報、特開平2-228563号公報他に提案されている。この従来技術は、固相上の試薬を洗浄する方法として、またB/F分離（結合型の部分-bound と遊離型の部分-free との分離）の操作を簡単に行う方法として、反応容器のフィルター上部から加圧し、フィルターの下に設けられた排出孔を介して液体を排出する。

【0010】また、核酸分析との関連付けはないが、特開平4-273065号公報は、微粒子を標識体として用いる高感度免疫分析方法を提案している。この従来技術では、微粒子を標識体として用い、抗原抗体反応などの特異反応により測定対象物量に比例した微粒子を反応固相に捕獲した後、これを遊離させて、遊離液中の微粒子数を計数することにより、測定対象物量を求める。遊離体を含む被測定液をフローセル中に導入し、流れと直交する方向から照射したレーザ光束中を微粒子が通過す

る際に発生するパルス状の蛍光を検出し、パルス数を数えることにより、微粒子を計数する。この従来技術では、一旦反応固相上に捕捉された標識物すなわち微粒子を遊離させてから計測するので、非特異的に固相に結合する標識物の影響を免れることができた。微粒子を標識とし、これを計数することにより、低濃度でも直線性の高い検出を実現している。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】上記のとおり従来行なわれてきた核酸の検出法は、放射性アイソトープでラベルされたDNAプローブが広く使用されている。アイソトープを使用するとコストが高くなる上、取り扱い際の安全性や廃棄の点を考慮しなくてはならない。また、従来の技術であるドットハイブリダイゼーション法やサンドウィッチハイブリダイゼーション法では検出対象の核酸の量が少ない場合に問題があり、その上、測定時に数多くの作業工程を必要とし、測定の自動化という面から見ると適しているとは言いがたい。

【0012】また、特公平3-78120号公報に記載の従来技術では、一本鎖ポリヌクレオチドに付けた標識物を反応により遊離させて測定している。しかし、遊離した標識物の測定は反応液全体の測定対象物の濃度に依存した形で行われるため、試料中の測定対象物がごく微量であった場合に検出感度が落ちる。また、反応容器の形状については言及しておらず、通常の有底の反応容器を使用した場合には洗浄工程やB/F分離作業が繁雑となり、これも測定の自動化という面から見ると適しているとは言いがたい。

【0013】特開平2-92300号公報に記載の従来技術も特公平3-78120号公報と同じ問題がある。

【0014】特開平2-228562及び特開平2-228563に記載の従来技術では、フィルターの下に排出孔を設けた反応容器を用いてフィルターの上部から加圧し、排出孔を介して液を排出することにより、洗浄工程及びB/F分離の操作を簡単にしている。しかし、遊離した標識物の測定は、フィルターの上に残っている反応液を反応容器ごと検出器の方へ持っていく方式である。この方式では反応容器を収用できる様な特別な検出器が必要な上、容器の壁を通して測定を行なうため感度の方にも問題がある。

【0015】特開平4-273065号公報に記載の従来技術では、遊離した標識体微粒子を測定するのに、当該微粒子を含む被測定液をフローセル中に導入し、光学的に微粒子数を計測しているため、高感度の測定が可能であるが、しかし、この従来技術でも有底の反応容器を使用しているため、洗浄工程やB/F分離作業が繁雑となり、これも測定の自動化という面から見ると適しているとは言いがたい。

【0016】本発明の目的は、自動的かつ高感度で試料中の核酸を測定することができる分析方法及び分析装置

並びに反応容器を提供することである。

【0017】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するため、本発明の分析方法は、(a) 粒径の異なる2種類の微小粒子であって、一方の微小粒子は標識物の付いた小粒子で、他方の微小粒子は前記小粒子よりも大きな粒径を持つ大粒子としたものを用意すること、(b) 前記2種類の微小粒子を試料中の測定対象物を介して結合させること、(c) 前記小粒子の粒径よりも大きく、前記大粒子の粒径よりも小さな孔径を持つフィルターを用いて未結合の小粒子を除去すること、(d) 測定対象物を介して結合した小粒子と大粒子の結合物を特異的に切断すること、(e) 前記フィルターを用いて小粒子のみを分別すること、(f) その小粒子の標識物を測定することによって試料中の測定対象物の濃度を測定することを特徴としている。

【0018】また、上記目的を達成するため、本発明の分析装置は、粒径の異なる2種類の微小粒子であって、一方の微小粒子は標識物の付いた小粒子で、他方の微小粒子は前記小粒子よりも大きな粒径を持つ大粒子としたものを用いて試料中の測定対象物の濃度を測定する分析装置において、(a) 少なくとも1つの反応室、前記反応室の底部に配置され、前記小粒子の粒径よりも大きく、前記大粒子の粒径よりも小さな孔径を持つフィルター、このフィルターの更に下方に設けられた液体流下抵抗部材、前記反応室から前記フィルター及び液体流下抵抗部材を通過した液体を排出する小孔を有する反応容器と、(b) 前記反応容器が複数個配列されるターンテーブルと、(c) 前記反応容器の反応室に前記試料、前記2種類の微小粒子を含む試薬、洗浄液及び結合部位を特異的に切断する試薬を注入する分注供給手段と、(d) 前記反応室と前記小孔との間に圧力差を発生させ、前記反応室内の液体を前記小孔から排出する圧力差発生手段と、(e) 前記小孔から排出された液体に含まれる前記小粒子の標識物を計測し、試料中の測定対象物の濃度を測定する計測手段とを備えることを特徴としている。

【0019】上記分析装置において、前記計測手段は好ましくは前記反応容器の小孔を介して液体が導入されるフローセルを有し、このフローセルを通る小粒子の標識物に基づく光学的特性を測定して試料中の測定対象物の濃度を測定する。また、好ましくは、前記反応容器の小孔は反応容器の下端に設けられた排出ノズルに形成され、この排出ノズルは前記フローセルの注入室入口に直接差し込まれる。

【0020】また、上記目的を達成するため、本発明の反応容器は、粒径の異なる2種類の微小粒子であって、一方の微小粒子は標識物の付いた小粒子で、他方の微小粒子は前記小粒子よりも大きな粒径を持つ大粒子としたものを用いて試料中の測定対象物の濃度を測定する分析方法に用いる反応容器において、少なくとも1つの反応

室と、前記反応室の底部に配置され、前記小粒子の粒径よりも大きく、前記大粒子の粒径よりも小さな孔径を持つフィルターと、このフィルターの更に下方に設けられた液体流下抵抗部材と、前記反応室から前記フィルター及び液体流下抵抗部材を通過した液体を排出する小孔とを有することを特徴としている。

【0021】上記反応容器は、好ましくは、前記反応室を形成しかつ前記フィルターを配置した第1の容器と、前記液体流下抵抗部材を配置しかつ前記小孔を形成した、前記第1の容器と別体の第2の容器とを有し、第1の容器と第2の容器は第1の容器の底部と第2の容器の頂部で結合可能である。

【0022】また、上記反応容器は、前記液体を排出する小孔のほかに吸引用的小孔を更に有していてもよい。また、上記反応容器は、前記反応室を含む複数の反応室を有していてもよい。更に、上記反応容器は、好ましくは、少なくとも1つの試料室を更に有し、前記試料室に前記標識物の付いた小粒子を含む試薬を保存液と共に収容する。

【0023】

【作用】本発明の分析方法においては、粒径の異なる2種類の微小粒子とそれらの粒径の中間の孔径を持つフィルターを用い、2種類の微小粒子を試料中の測定対象物を介して結合した後の未結合の小粒子はフィルターに通過することで排出され(B/F分離)、また小粒子と大粒子の結合物を切断した後の小粒子もフィルターに通過することで分別される(B/F分離)。また、洗浄液を注入すれば、その洗浄液もフィルターを通して排出され、反応室及びフィルターが洗浄される。このように、2種類の微小粒子とそれらの粒径の中間の孔径を持つフィルターを用いてB/F分離や洗浄工程を行なうため、容器を傾けたりピペッティングノズルを用いて反応液や洗浄液を取り出す等の操作が不要となり、B/F分離や洗浄工程が極めて簡単となり、測定の自動化が容易となる。また、分別した蛍光性の微小粒子は直接フローセルに導入することができ、操作時間を短縮できる。更に、標識物をフローセルで測定できるので、高感度な測定が可能となる。

【0024】本発明の分析装置においては、試料と上記2種類の微小粒子を含む試薬とを分注供給手段を用いて反応容器の反応室に注入し、反応室中で2種類の微小粒子を試料中の測定対象物を介して結合させ、次に圧力差発生手段を用いて反応室と小孔との間に圧力差を発生させ、未結合の小粒子を液体流下抵抗部材の抵抗に抗してフィルターを通して除去する。このとき、分注供給手段を用いて必要に応じて洗浄液を注入し、反応室及びフィルターを洗浄する。次いで、接合部位を特異的に切断する試薬を分注供給手段を用いて反応室に注入し、小粒子と大粒子の結合物を切断し、再び圧力差発生手段を用いて切断後の小粒子を液体流下抵抗部材の抵抗に抗してフ

フィルターを通して分別する。このときも必要に応じ分注供給手段を用いて洗浄液を注入する。このように分別された標識物の付いた微小粒子である小粒子は計測手段、好ましくはフローセルに導入され、小粒子の標識物を計測し、試料中の測定対象物の濃度が測定される。このように本発明の分析方法を実施できる。

【0025】反応容器の小孔を反応容器の下端に設けられた排出ノズルに形成し、この排出ノズルをフローセルの注入室入口に直接差し込むことにより、非測定液のフローセルへの移送が容易となり、測定時間が短縮される。

【0026】更に、反応容器の少なくとも1つの試料室に標識物の付いた小粒子を含む試薬を保存液と共に収容することにより、測定時間が更に短縮される。

【0027】

【実施例】まず、本発明の分析方法の一実施例を図1により説明する。まず、標識物の付いた微小粒子401に結合させたポリヌクレオチド（DNAプローブ）402を含む第1の試薬と、標識物の付かない微小粒子403に結合させたポリヌクレオチド（DNAプローブ）404を含む第2の試薬とを準備する。ここで、第1及び第2の試薬のポリヌクレオチド（DNAプローブ）402、404としては、試料中の測定対象物であるサンプルDNAに対して相補的なヌクレオチド配列を持つが、互いには相補的なヌクレオチド配列を持たないものを使用する。また、第1の試薬の微小粒子401は小粒子とし、第2の試薬の微小粒子403は第1の試薬の微小粒子401よりも大きな粒径を持つ大粒子とする。標識物の付いた微小粒子401としては蛍光性の微小粒子を用いるのが好適である。

【0028】このようにして第1及び第2の試薬を準備した後、反応容器の反応室に試料と第1の試薬とを注入し（図1）、試料中のサンプルDNA405と第1の試薬中の蛍光粒子標識DNAプローブ402とをハイブリダイズして二本鎖を形成させる（図1）。次いで、反応容器の反応室に第2の試薬を注入し（図1）、試料中のサンプルDNA405と第2の試薬中の非蛍光粒子結合DNAプローブ404とを更にハイブリダイズして二本鎖を形成させる（図1）。

【0029】このようにして2種類の微小粒子401、403をサンプルDNA405に結合した後、第1の試薬中の微小粒子401の粒径よりも大きく、第2の試薬中の微小粒子403の粒径よりも小さな孔径を持つフィルター406を用いて、反応液をフィルター406を通して排出させ、未結合の余剰蛍光粒子標識DNAプローブ402を除去し、第1のB/F分離を行なう（図1）。このとき、必要に応じて洗浄液を注入し、反応容器及びフィルター406を洗浄する。これらの操作は、今まで使用した反応容器にフィルター406と共に反応液の排出を制御できる機構を設けて行なってもよいし、

フィルター406と排出開口を備えた別の反応室を用いて行なってもよい。

【0030】次いで、反応室に適当な制限酵素液を注入して制限酵素407を作用させ、ハイブリダイゼーションによって形成した二本鎖部位を切断する（図1）。これにより、フィルター406にトラップされた蛍光性の微小粒子401が遊離し、遊離した蛍光性の微小粒子401は上記と同様に反応液と共にフィルター406を通して分別される（図1）。このようにして第2のB/F分離を行なう。このときも、必要に応じて洗浄液を添加する。

【0031】このようにして分別された蛍光性微小粒子401を含む排出液はフローセルに導入され、フローセルを通る微小粒子に基づく蛍光を検出し、粒子数を計数する。計数された粒子数に基づいて上記試料中の測定対象物であるサンプルDNAの濃度を演算することができる。

【0032】以上のような分析方法によれば、粒径の異なる2種類の微小粒子401、403とそれらの粒径の中間の孔径を持つフィルター406を用いてB/F分離や洗浄工程を行なうため、容器を傾けたりピペッティングノズルを用いて反応液や洗浄液を取り出す等の操作が不要となり、B/F分離や洗浄工程が極めて簡単となる。このため、測定の自動化が容易となる。また分別した蛍光性の微小粒子401を直接フローセルに導入することも可能であり、操作時間を短縮できる。また、標識物をフローセルを用いて計数するので、高感度な測定が可能となる。

【0033】なお、以上の実施例で、蛍光粒子標識DNAプローブ402を含む第1の試薬と非蛍光粒子結合DNAプローブ404を含む第2の試薬の注入順序は逆でもよいし、同時でもよい。

【0034】次に、以上の分析方法を実施するための装置及びその分析方法に使用する反応容器の実施例を図2～図7により説明する。

【0035】図2は本発明の分析方法を実施するための自動分析装置の全体構成を示す概略図であり、図3～図5はその分析方法に使用する反応容器の構成を示す図である。

【0036】図1において、本実施例の自動分析装置は4つのターンテーブル1、2、3、35を有している。ターンテーブル1には、血液などの試料を収容した複数のサンプル容器33がサークル状に配列されている。また、ターンテーブル2には複数の反応容器34aがサークル状に配列され、ターンテーブル3上には複数の反応容器34bがサークル状に配列されている。更に、ターンテーブル35は試薬テーブルであり、分析操作に必要な各種の試薬液容器がサークル状に配列されている。すなわち、核酸を測定対象とする分析項目A、B、Cにそれぞれ対応する第1の試薬である蛍光性粒子標識プロー

ブ液を収容した容器90a, 90b, 90cと、第2の試薬である粒子結合プローブ液を収容した容器36a, 36b, 36cと、制限酵素液収容容器38と、洗浄液その他必要な緩衝液の容器等が試薬テーブル35上に保持されている。第2の試薬である粒子結合プローブ液に含まれる粒子は、第1の試薬である蛍光性粒子標識プローブ液に含まれる蛍光性粒子よりも大きな粒径を有している。

【0037】ターンテーブル1, 2, 35は、図示しないコントローラによって制御されるパルスモータ91, 92, 93によって所望のサンプル容器33あるいは反応容器34aあるいは試薬液容器を、ピペッティングノズル43による吸引位置あるいは吐出位置にて停止するように回転自在に構成されている。ターンテーブル3も図示しないコントローラによって制御されるパルスモータ94によって所望の反応容器34bをターンテーブル2上の反応容器34aと整合する位置にて停止するように回転自在に構成されている。また、ターンテーブル2には、ターンテーブル2を上下動させる駆動装置95が設けられている。

【0038】反応容器34aは、図3に示すように、複数の反応室341, 342と複数の試料室343, 345を有し、反応室の1つである反応室341は底部が開口しており、その開口した底部にフィルター346が配置されている。反応容器34bは、図4に示すように、上部にキャップ347と下部に小孔348を持つ排出ノズル348aとを有している。キャップ347は反応容器34aのフィルター346の下部開口部と図5に示すように結合可能であり、またその下部開口部に結合したとき反応室341と小孔348との間に圧力差がなければ反応室341内の液が保持される液体流下抵抗部材としての構造を持つ。具体的には、キャップ347を弾性のある素材で構成し、図4(B)に示すようにその素材に十文字の切れ目を入れ、キャップ347の上下で圧力差が生じるとその切れ目が開き、圧力差がなくなれば閉じるような構造である。反応室341と小孔348との間に発生させる圧力差は、本実施例では図2に示すように加圧源102に接続された加圧装置101で反応室341側から加圧することにより発生させる。

【0039】フィルター346は、第1の試薬である蛍光性粒子標識プローブ液に含まれる蛍光性粒子の粒径より大きく、第2の試薬である粒子結合プローブ液に含まれる粒子の粒径より小さな孔径を有している。

【0040】39は自動ピペット機構であり、可動アーム42に取り付けられた上記ピペッティングノズル43、可動アーム42を水平回転させるための回転駆動部45、可動アーム42を上下動するための上下駆動部44、チューブ41を介してノズル43に接続されたシリンジポンプ40、押出液を兼ねた洗浄液槽37、ノズル洗浄槽96を備えている。可動アーム42の動作に伴っ

てピペッティングノズル43は、ターンテーブル1上の試料吸入位置、ターンテーブル35上の試薬吸入位置、ターンテーブル2上の試料・試薬分注位置、及びノズル洗浄槽96の上を回転半径として回転することができ、それぞれの位置で下降及び上昇することができる。

【0041】ターンテーブル1, 2, 3, 35及び自動ピペット機構は反応恒温槽98内に配置されている。

【0042】以上の装置の動作は次の用である。まず、サンプル容器33内のサンプルの移送を、ピペッティングノズル43によって行なう。即ち、ピペッティングノズル43によりサンプルの一定量が吸入され、サンプル吐出位置に移送された反応容器34a内の試料室343内に吐出され、必要に応じて希釈をされた後、ピペッティングノズル43によって、反応室342へ吐出される。

【0043】パルスモータ93は試薬テーブル35を所望の角度回転し、必要なタイミングで指定された試薬容器をノズル43による吸入位置に停止するように位置づける。第1の試薬は、ノズル43によって第1の試薬分注位置で反応容器34aの反応室342内に注入される（図1参照）。また、第2の試薬は、ノズル43によって第2の試薬分注位置で反応容器34aの反応室342内に注入される（図1参照）。

【0044】いま、反応容器34aが第1試薬の分注位置にくと、ノズル43により第1の試薬が一定量吸入されて分注位置に移送されている反応容器34a内の反応室342に分注する。この動作が終わると、ターンテーブル2は反時計方向に360°+反応容器1ピッチ（1サイクル）分回転して停止する。いま、ターンテーブルの回転及び停止している間の時間を20秒とすると、20秒を1サイクルとして上記の動作を繰り返す。すなわち、第1の試薬が分注された特定の反応容器34aは、上記サイクルが進むにつれてターンテーブル2が停止している状態での位置が反応容器1ピッチ分ずつ反時計方向に進むことになる。第1の試薬が分注された特定の反応容器についてみたとき、ターンテーブル2が停止している状態での位置が例えば反応容器1ピッチ分進んだ位置で、第2の試薬を分注する。これにより、反応容器34a内の反応室342には、試料、第1試薬及び第2試薬が分注され、反応が進行する。

【0045】反応容器34aの反応室342中で反応させた試料と粒子標識プローブと蛍光性粒子標識プローブとのハイブリダイゼーション反応液は、反応液分注位置においてピペッティングノズル43によって反応容器34aの反応室341に注入される。フィルタ洗浄位置においては、加圧装置101が作動して、フィルタ346の孔径よりも小さな未反応の第1の試薬中の蛍光性粒子プローブをフィルター346に通して反応容器外に排出する（図1参照）。ノズル43によって洗浄液を反応室341に注入して加圧装置101を作動させることを

繰り返して、フィルター346の洗浄を徹底する。

【0046】反応室341の洗浄を終了すると、図6に示すように、容器結合位置において駆動装置95の作動でターンテーブル2が下降して、反応容器34aにターンテーブル3上の容器34bを結合した後、駆動装置95が逆方向に作動してターンテーブル2を上昇させる。その後、制限酵素液分注位置において、ノズル43によって制限酵素液収容容器38から制限酵素液が分注される(図1参照)。所定時間を経過した後に測定液取り出し位置において駆動装置95が作動してターンテーブル2を加工させ、容器34bの排出ノズル348aを図7に示すようにシースフローセル47の注入室入口48に差し込み、加圧装置101が作動して測定液が小孔348よりシースフローセル47内に導入される(図1参照)。

【0047】シースフローセル47の内部構成は、既知のフローサイトメータで用いられているものと同様であるが、上方には特開平2-80937号公報に示されているものと同様の試薬注入室が開口されている。それゆえ、小孔348を介して注入室入口48から被測定液をシースフローセル47内に吐出することができる。そして、送液ポンプ9によってシース液槽6内のシース液が一定流量で送液され、フローセル47の内壁に沿って流れ、廃液溜95に排出される。フローセル47内に導入された被測定液は、シース液の流れの中央を流れる。

【0048】レーザ光源49は、発振波長が488nmのアルゴンレーザを射出することができ、このレーザ光束はビームエキスパンダ50でビーム幅を広げられた後、レンズ51によって絞られ被測定液の流れに合焦点するようにシースフローセル47に照射される。フローセル47からの蛍光の集光には顕微鏡用の対物レンズ52を用いている。光電検知器としてのフォトマルチプライヤ53の前に空間フィルタ54及び波長選択フィルタ55を設け、散乱光及びラマン光を除去する。フォトマルチプライヤ53の出力をプリアンプ18で増幅した後、リニアアンプ19で増幅し、下限波高弁別器20a及び上限波高弁別器20bによりノイズを除去する。その後2種の閾値の間にあるパルスのカウンタ56で積算する。

【0049】トランス96及び高圧電源97を介してフォトマルチプライヤ53には高電圧が印加される。試料番号、計数結果、検量線、蛍光測定ヒストグラム、等はディスプレイ57、プリンタ22、フロッピーディスク58に出力する。またインターフェイス59を介して、パーソナルコンピュータとも通信できる。

【0050】次に、核酸分析を一例にとり具体例を説明する。核酸分析のそれぞれの測定対象項目に関する反応の過程は似通っているため、ここではHBV(B型肝炎ウイルス)の場合を例にとって、反応容器内における分析操作過程を説明する。分析項目は、操作開始後に加え

られる粒子プローブの種類によって特定される。

【0051】蛍光性粒子標識プローブ液容器90aには、蛍光性物質としてのクマリン誘導体が含有されている蛍光標識ラテックス粒子(直径0.1μm)に一本鎖HBV-DNAプローブタイプ1を結合させた蛍光標識ラテックス粒子試薬を準備しておく。一方、粒子結合プローブ液容器36aには、一本鎖HBV-DNAプローブタイプ2を固定化したラテックス粒子試薬(直径0.9μm)を準備しておく。それぞれの一本鎖HBV-DNAプローブ(一本鎖HBV-DNAプローブタイプ1と一本鎖HBV-DNAプローブタイプ2)は、測定対象の核酸成分に対して相補的なヌクレオチド配列を持つが、互いには相補的なヌクレオチド配列を持たないものを使用した。

【0052】制限酵素液としては、蛍光標識ラテックス粒子に結合させた一本鎖HBV-DNAプローブタイプ1と測定対象の核酸成分がハイブリダイズして形成した二本鎖DNAを切断する制限酵素として、例えばHaeIIIを準備しておく。

【0053】分析操作が開始されると、ノズル43により蛍光標識ラテックス粒子試薬を試薬テーブル35上の容器60aからノズル43で一定容量吸入し、対応する反応容器34a内の反応室342に吐出することによって、当該反応容器をHBV分析用であることを特定する。

【0054】このようにして準備された反応容器34aの反応室342には、次いでサンプル容器33からノズル43によって分取された試料が添加される。試料中のHBV-DNAは、一本鎖HBV-DNAプローブタイプ1を結合させた蛍光標識ラテックス粒子と反応する。この反応を15分間行わせた。

【0055】次に、ラテックス粒子試薬液容器34aからラテックス粒子試薬をノズル43で一定量吸入し、対応する反応容器34aの反応室342に吐出する。反応容器34aは所定温度(37℃)のもとで一定時間(15分間)ターンテーブル上で反応を維持する。これにより、先のハイブリダイズ反応物にさらに一本鎖HBV-DNAプローブタイプ2が反応する。

【0056】ターンテーブル2上の反応液分注位置では、反応容器34aの反応室341の上部に加圧装置101が配置されている。該位置に反応容器34aが移送されると、ピペッティングノズル43によって反応液を反応容器34aの反応室341に注入する。フィルター346は孔径0.6μm、直径10mmのメンブレンフィルタを使用した。フィルタ洗浄位置においては、ノズル43によって洗浄液を反応容器34a内の反応室341に注入して加圧装置101を作動させることを繰り返した。次いで、ターンテーブル3の回転により反応容器43bがターンテーブル2上の対応する反応容器34aの反応室341と結合した後、試薬テーブル35の回転

により吸入位置に制限酵素液容器 3 8 が位置付けられ、その容器 3 8 内の制限酵素 Hae III を含む液がピペッティングノズル 4 3 により一定量吸入され、ターンテーブル 2 上の対応する反応容器 3 4 a の反応室 3 4 1 に吐出される。反応室 3 4 1 では、蛍光標識ラテックス粒子に結合させた一本鎖 HBV-DNA プローブタイプ 1 と測定対象の核酸成分がハイブリダイズして形成した二本鎖 DNA が、所定の切断箇所て切断される。これにより、反応室 3 4 1 内の液に蛍光標識ラテックス粒子が浮遊する。これらの遊離体を含む被測定液は、測定液取り出し位置において、加圧装置 1 0 1 が作動して測定液がとりだされてシースフローセル 4 7 に吐出される。

【0057】本発明の分析方法で使用される反応容器の他の実施例を図 8 に示す。この実施例では、反応容器 6 0 は図 3 ～図 5 に示したものと異なり一体構造をしている。即ち、反応容器 6 0 はフィルター 3 4 6 を備えた容器部と、液体流下抵抗部材としてのキャップ 3 5 5 及び小孔 6 0 7 を持つ排出ノズル 6 0 7 a を備えた容器部とが一体になっている。本実施例ではこのように 2 つの容器部が一体であるため、ターンテーブル 3 は不要となる。

【0058】更に、反応容器の他の実施例として、図 9 及び図 1 0 に示すような反応容器 3 4 a、3 4 c を用いてもよい。この実施例では、反応容器 3 4 c は容器の壁面に小孔 3 5 1 を形成した排出ノズル 3 5 1 を備えている。この場合、図 2 に示す自動分析装置において、加圧装置 1 0 1 に加えて吸引装置が必要となる。この吸引装置は、2 つの容器 3 4 a、3 4 c が図 9 に示すように結合されているとき容器 3 4 c の小孔 3 5 1 を持つ排出ノズル 3 5 1 a に接続され、小孔 3 5 1 から吸引することにより、液体流下抵抗部材であるキャップ 3 5 0 の前後に圧力差を発生させ、反応室 3 4 1 内の反応液を容器 3 4 c 内に移動させる。

【0059】本実施例の反応容器 3 4 a、3 4 c を用いた図 2 に示す自動分析装置の動作は次のようである。

【0060】まず、サンプル容器 3 3 内のサンプルの移送は、ピペッティングノズル 4 3 によって行なわれる。ピペッティングノズル 4 3 によりサンプルの一定量が吸入され、サンプル吐出位置に移送された反応容器 3 4 a 内の試料室 3 4 3 内に吐出され、必要に応じて希釈をされた後、ピペッティングノズル 4 3 によって、反応室 3 4 2 へ吐出される。

【0061】パルスモータ 9 3 は試薬テーブル 3 5 を所望の角度回転し、必要なタイミングで指定された試薬容器をノズル 4 3 による吸入位置に停止するように位置づける。すなわち、第 1 の試薬は、ノズル 4 3 によって第 1 の試薬分注位置で反応容器 3 4 a の反応室 3 4 2 内に注入される。また、第 2 の試薬は、ノズル 4 3 によって第 2 の試薬分注位置で反応容器 3 4 a の反応室 3 4 2 内に注入される。

【0062】反応容器 3 4 a の反応室 3 4 2 中で反応させた試料と粒子標識プローブと蛍光性粒子標識プローブとのハイブリダイゼーション反応液は、反応液分注位置においてピペッティングノズル 4 3 によって反応容器 3 4 a の反応室 3 4 1 に注入される。フィルタ洗浄位置においては、加圧装置 1 0 1 が作動して、フィルタ 3 4 6 の孔径よりも小さな未反応の第 1 の試薬中の蛍光性粒子プローブをフィルター 3 4 6 に通して反応容器外に排出する。ノズル 4 3 によって洗浄液を反応室 3 4 1 に注入して加圧装置 1 0 1 を作動させることを繰り返して、フィルター 3 4 6 の洗浄を徹底する。

【0063】反応室 3 4 1 の洗浄を終了すると、図 6 に示すように、容器結合位置において駆動装置 9 5 の作動でターンテーブル 2 が下降して、反応容器 3 4 a にターンテーブル 3 上の容器 3 4 c を結合した後、駆動装置 9 5 が逆方向に作動してターンテーブル 2 を上昇させる。その後、制限酵素液分注位置において、ノズル 4 3 によって制限酵素液収容容器 3 8 から制限酵素液が分注される。所定時間を経過した後に図示しない吸引装置が排出ノズル 3 5 1 a に接続され、小孔 3 5 1 より吸引を行なうことによって、反応室 3 4 1 内の反応液を容器 4 3 c の方へ移動させる。その後、容器 3 4 a と容器 3 4 c は分離し、容器 3 4 c は測定液取り出し位置へ移動する。測定液取り出し位置において、測定液がノズル 4 3 により容器 3 4 c より取り出され、シースフローセル 4 7 内に導入される。

【0064】反応容器の更に他の実施例として、図 1 1 及び図 1 2 に示すような反応容器 3 4 a と反応容器 3 4 f との組み合わせでもよい。この場合、反応容器 3 4 f は吸引孔 3 5 3 を持つノズル 3 5 3 a と排出のための小孔 3 5 4 を持つ排出ノズル 3 5 4 a とが別になっており、測定液は小孔 3 5 3 が吸引されることによりキャップ 3 5 2 の抵抗にうち勝って小孔 3 5 4 から取り出され、シースフローセル 4 7 内に導入される。

【0065】また、図 1 1 及び図 1 2 に示す反応容器は、図 8 に示す場合と同様、図 1 3 に示す反応容器 6 0 のようにフィルター 3 4 6 を備えた容器部と、液体流下抵抗部材としてのキャップ 3 5 6 及び小孔 6 0 8、6 0 9 をそれぞれ持つノズル 6 0 8 a、6 0 9 a を備えた容器部とが一体になっていてもよく、この場合は、やはりターンテーブル 3 は不要となる。

【0066】また、反応容器の試料室の 1 つ、例えば反応容器 3 4 a の試料室 3 4 5 に蛍光性粒子標識プローブ液または粒子結合プローブ液を保存液と共に入れておくこともできる。この場合、第 1 の試薬もしくは第 2 の試薬の収容容器は入らなくなり、かつ測定時間の更なる短縮が可能となる。

【0067】

【発明の効果】本発明によれば、粒径の異なる 2 種類の微小粒子とそれらの粒径の中間の孔径を持つフィルター

を用いてB/F分離や洗浄工程を行なうので、容器を傾けたりピペッティングノズルを用いて反応液や洗浄液を取り出す等の操作が不要となり、B/F分離や洗浄工程が極めて簡単となり、測定の自動化が容易となる。また、分別した蛍光性の微小粒子は直接フローセルに導入することができ、操作時間を短縮できる。更に、標識物をフローセルで測定できるので、高感度な測定が可能となる。

【0068】また、本発明によれば、反応容器の小孔を反応容器の下端に設けられた排出ノズルに形成し、この排出ノズルをフローセルの注入室入口に直接差し込んで計測を行なうので、測定時間を短縮できる。

【0069】更に、反応容器の試料室に標識物の付いた小粒子を含む試薬を保存液と共に收容するので、測定時間の更なる短縮が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例による分析方法の操作手順を説明する図である。

【図2】本発明の一実施例による分析装置の全体構成を示す概略図である。

【図3】図2に示す装置で使用される反応容器の一実施例を示す図で、(A)は縦断面図、(B)は上面図である。

【図4】図2に示す装置で使用される反応容器の一実施例を示す図で、(A)は縦断面図、(B)は上面図である。

【図5】図3に示す容器と図4に示す容器を結合した状態を示す縦断面図である。

【図6】図3に示す容器と図4に示す容器を結合する操作手順を示す図で、(A)は結合前の状態、(B)は結合時の状態、(C)は結合後の状態を示す。

【図7】図3及び図4に示す反応容器の排出ノズルをフローセルに差し込む様子を示す縦断面図である。

【図8】本発明の他の実施例による反応容器の縦断面図 *

* である。

【図9】本発明の更に他の実施例による反応容器の縦断面図である。

【図10】図9に示す反応容器の下方部分の断面図である。

【図11】本発明の更に他の実施例による反応容器の縦断面図である。

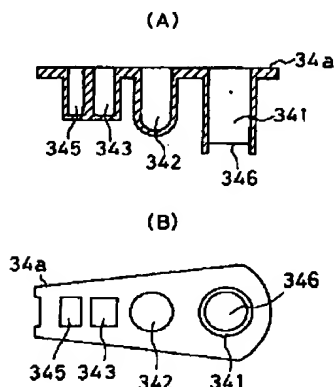
【図12】図11に示す反応容器の下方部分の断面図である。

10 【図13】本発明の更に他の実施例による反応容器の縦断面図である。

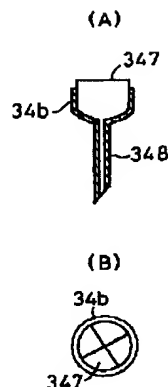
【符号の説明】

- 1, 2, 3 ターンテーブル
- 33 サンプル容器
- 34a, 34b 反応容器
- 35 ターンテーブル(試薬テーブル)
- 36a, 36b, 36c 蛍光性粒子標識プローブ液容器
- 38 制限酵素液收容容器
- 42 可動アーム
- 43 ピペッティングノズル
- 46 コントローラ
- 47 シースフローセル
- 48 注入室入口
- 56 カウンタ
- 90a, 90b, 90c 粒子標識プローブ液容器
- 94 ノズル洗浄槽
- 102 コンプレッサー
- 401 サンプルDNA
- 402 蛍光粒子標識DNAプローブ
- 403 非蛍光粒子標識DNAプローブ
- 404 フィルター
- 405 制限酵素

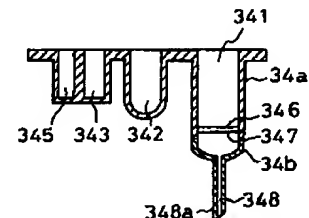
【図3】



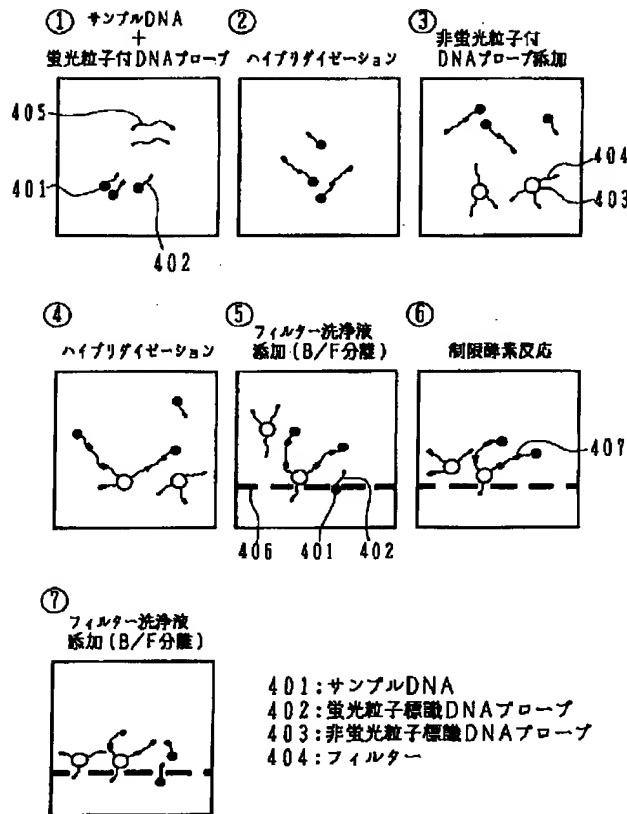
【図4】



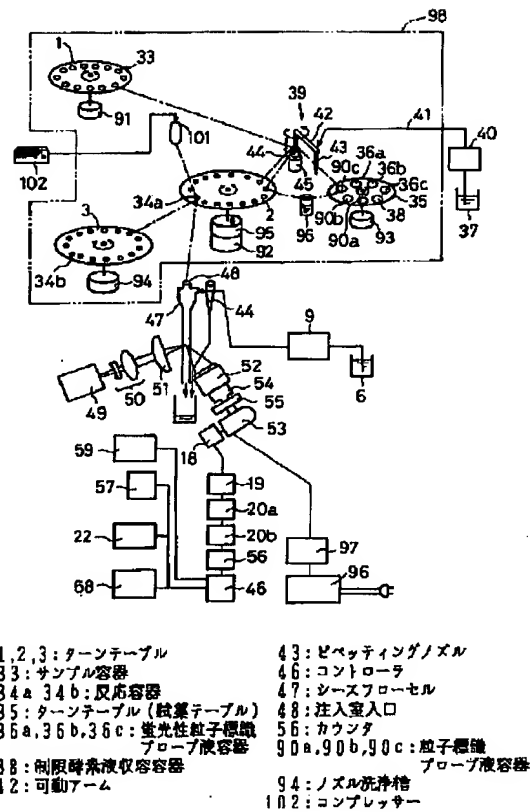
【図5】



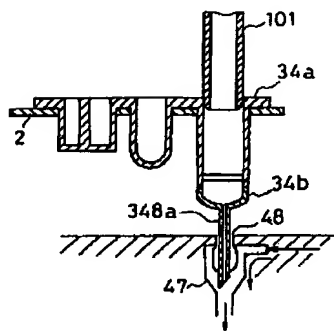
【図1】



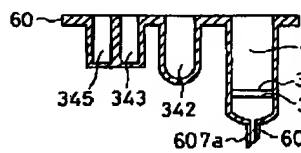
【図2】



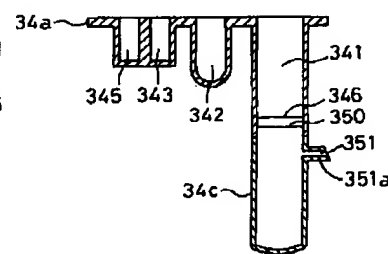
【図7】



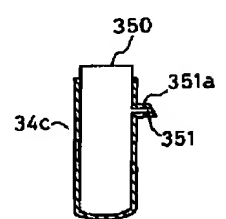
【図8】



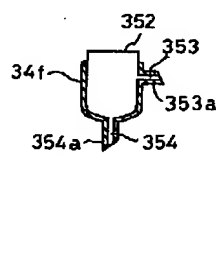
【図9】



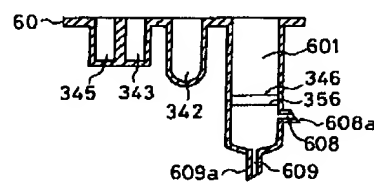
【図10】



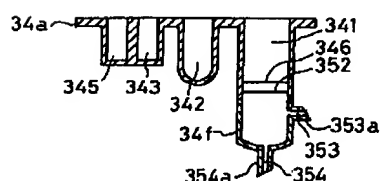
【図12】



【図13】



【図11】



【図6】

